

Effacité des STERRADs vis-à-vis des Prions

Etudes *in vitro* & *In vivo*



Encéphalopathies Spongiformes Subaigües Transmissibles _ ESST

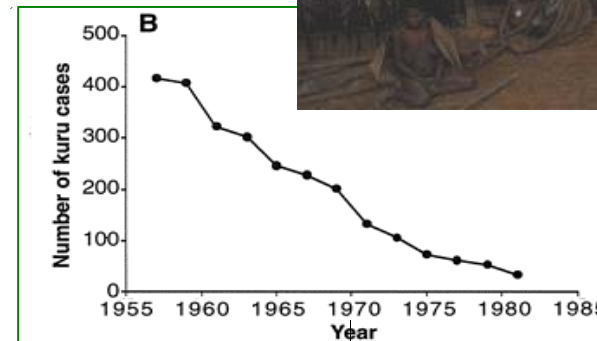
ANIMAUX

- Tremblante naturelle du mouton et de la chèvre – Europe – 1732
- Encéphalopathie Spongiforme Bovine (ESB, 180 000 cas – plus de 900 000 bovins contaminés) – RU – 1985
- Encéphalopathie Spongiforme Féline (FSE) – 1990
- Chronic Wasting Disease (CWD) – considérée comme ESST depuis 1978



HOMME

- Maladie de Creutzfeldt-Jakob (MCJ) – Europe – 1920
- Kuru – Nouvelle Guinée – 1951
- Syndrome de Gerstmann-Sträussler-Scheinker
- Insomnie Fatale Familiale (IFF)
- Variant de la MCJ (vMCJ) – 1995



ESST: Caractéristiques

- **Transmissibles mais pas contagieuses**
- **Période d'incubation longue et cliniquement silencieuse**
 - Age médian pour évolution clinique : 62 vs. 29 ans pour vMCJ
 - Durée de la maladie également différente : 14 mois pour vMCJ
- **Neurodégénérescence du système nerveux central (SNC)**
- **Evolution clinique sans rémission et rapidement mortelle**
- **Lésions anatomopathologiques limitées au système nerveux central**
- **Absence de réaction inflammatoire ou immunitaire ou de démyélinisation du SNC**
- **Aucune structure évocatrice d'un microorganisme dans le SNC**

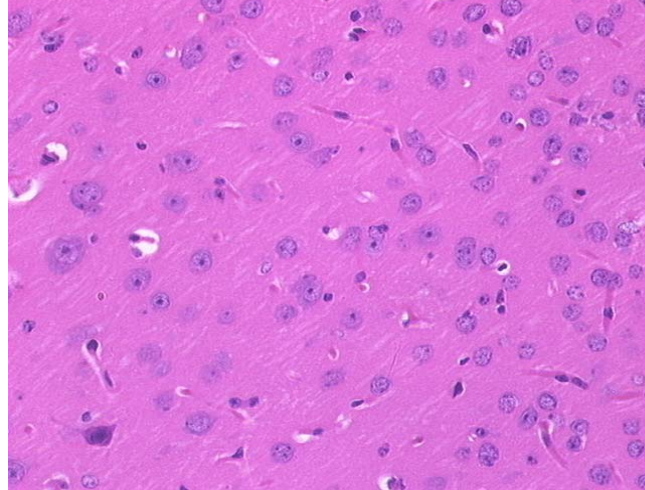
Diagnostic clinique & biologique

- **Démence rapide**
- **Ataxie et incoordination des mouvements**
- **Myoclonie (spasmes musculaires)**
- **Symptômes psychiatriques (Etat dépressif) _spécifiques de la vMCJ**
- **Pas de manifestation clinique, classique d'une infection (ni fièvre ni symptôme grippal)**
- **Pas d'anomalies au niveau du sang ou du liquide céphalorachidien**
- **Pas de réponse immune** (Absence d'un test diagnostic non-invasif pour les phases, pré-clinique et clinique)

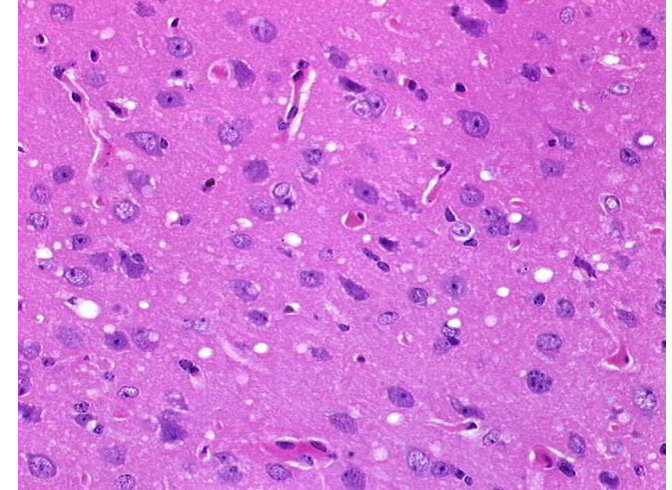
ESST Neuropathologie: Similitudes pour toutes les espèces infectées

- **Mort neuronale**

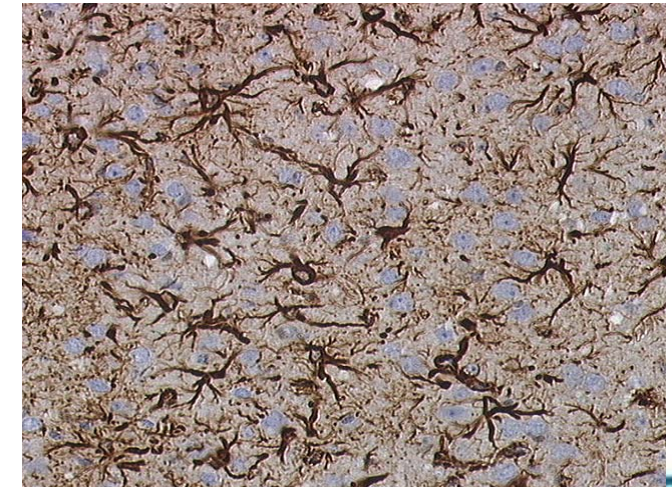
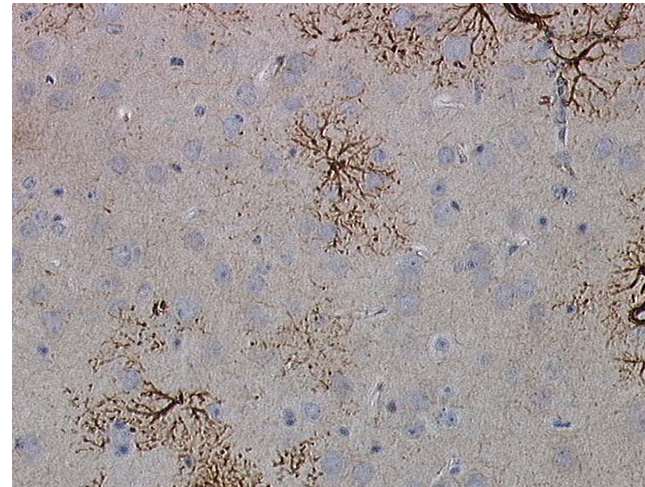
Témoin Non-infecté



Hamster infecté



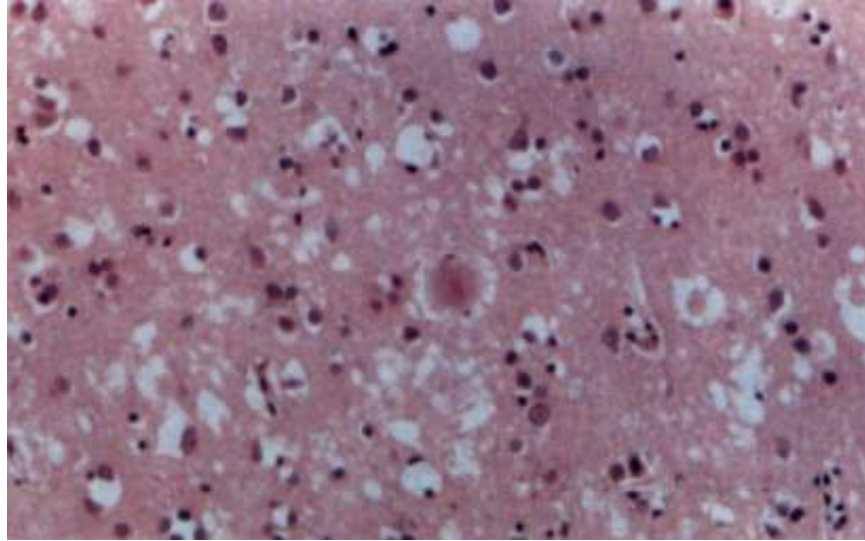
- **Spongiose (neuropile)**



- **Astrogliose**

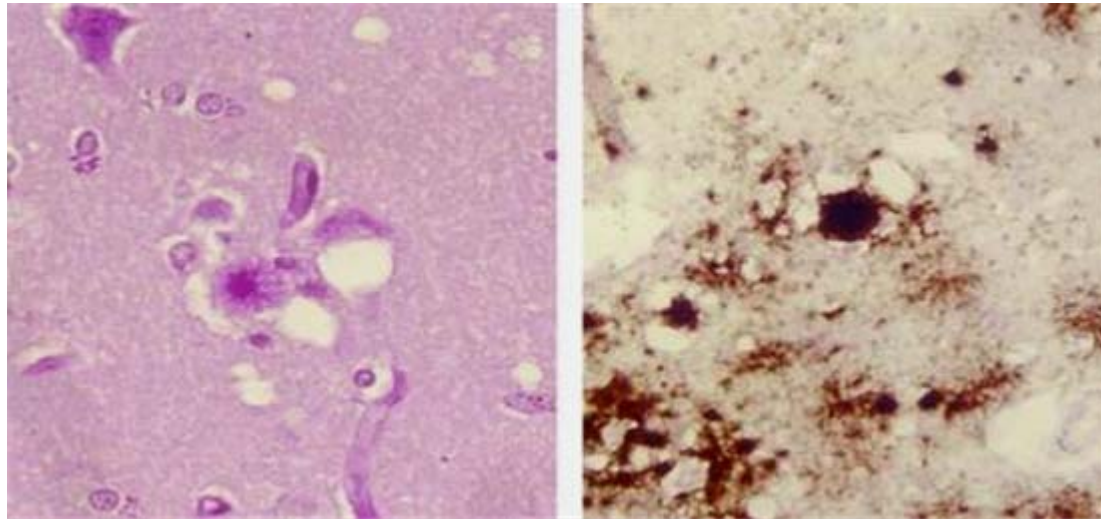
ESB & vMCJ neuropathologie

- Spongiose



- Dépôts amyloïdes de PrP (plaques florides)

Majeur et spécifique de la vMCJ

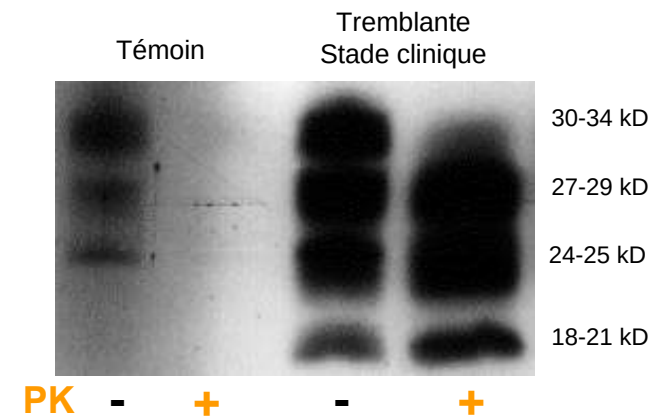
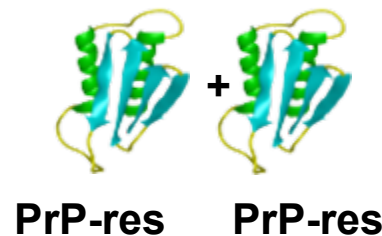
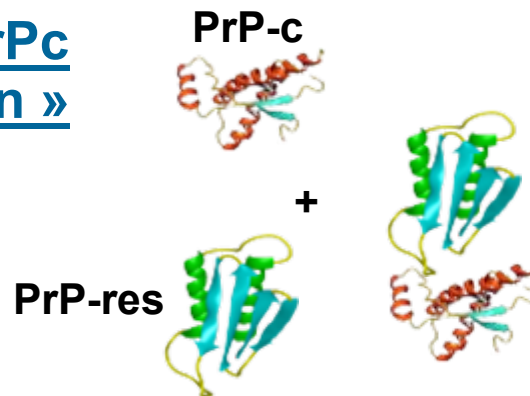


Brandel, 2001

L'hypothèse Prion

- **Protéine Prion** : Seule protéine à s'accumuler spécifiquement lors des ESST, avec un titre proportionnel à celui de l'infectiosité
- Les prions sont composés de molécules **PrPsc** (définies par leur résistance à la PK)
- La **PrPres** qui s'accumule chez les personnes infectées est issue de la forme normale de la PrP (**PrPc**; ce n'est pas la seule PrPres de l'inoculum)

PrPsc issue de la PrPc
« Transconformation »



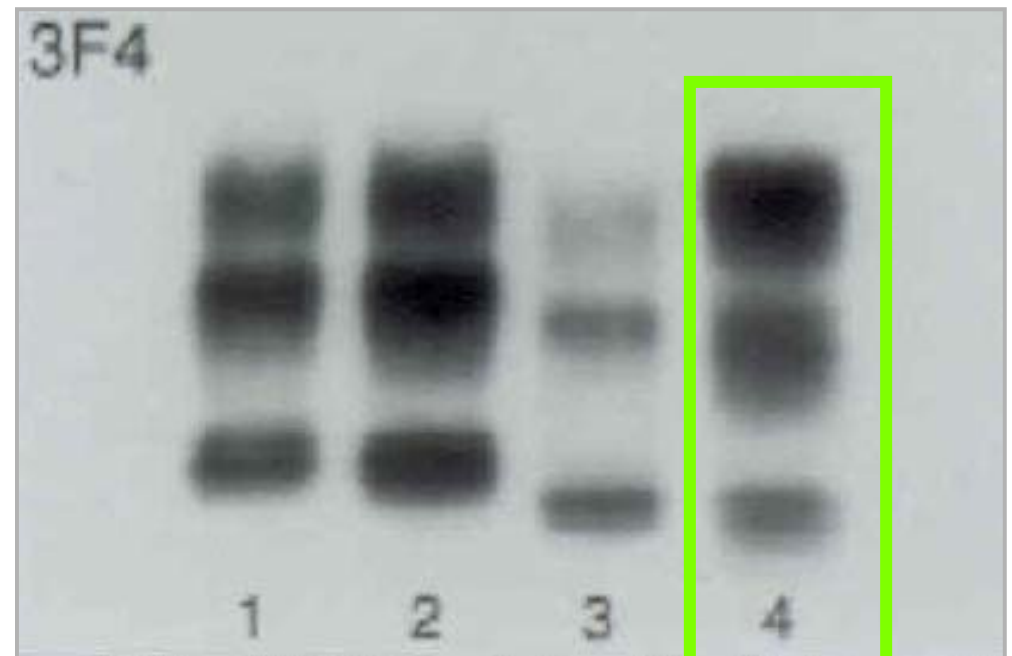
L'Hypothèse Prion

- La diversité des souches est « portée » par la structure tertiaire de la PrP^{sc}

Rôle du « codon 129 »

Profil électrophoretique de la PrP^{res} de différentes formes de MCJ

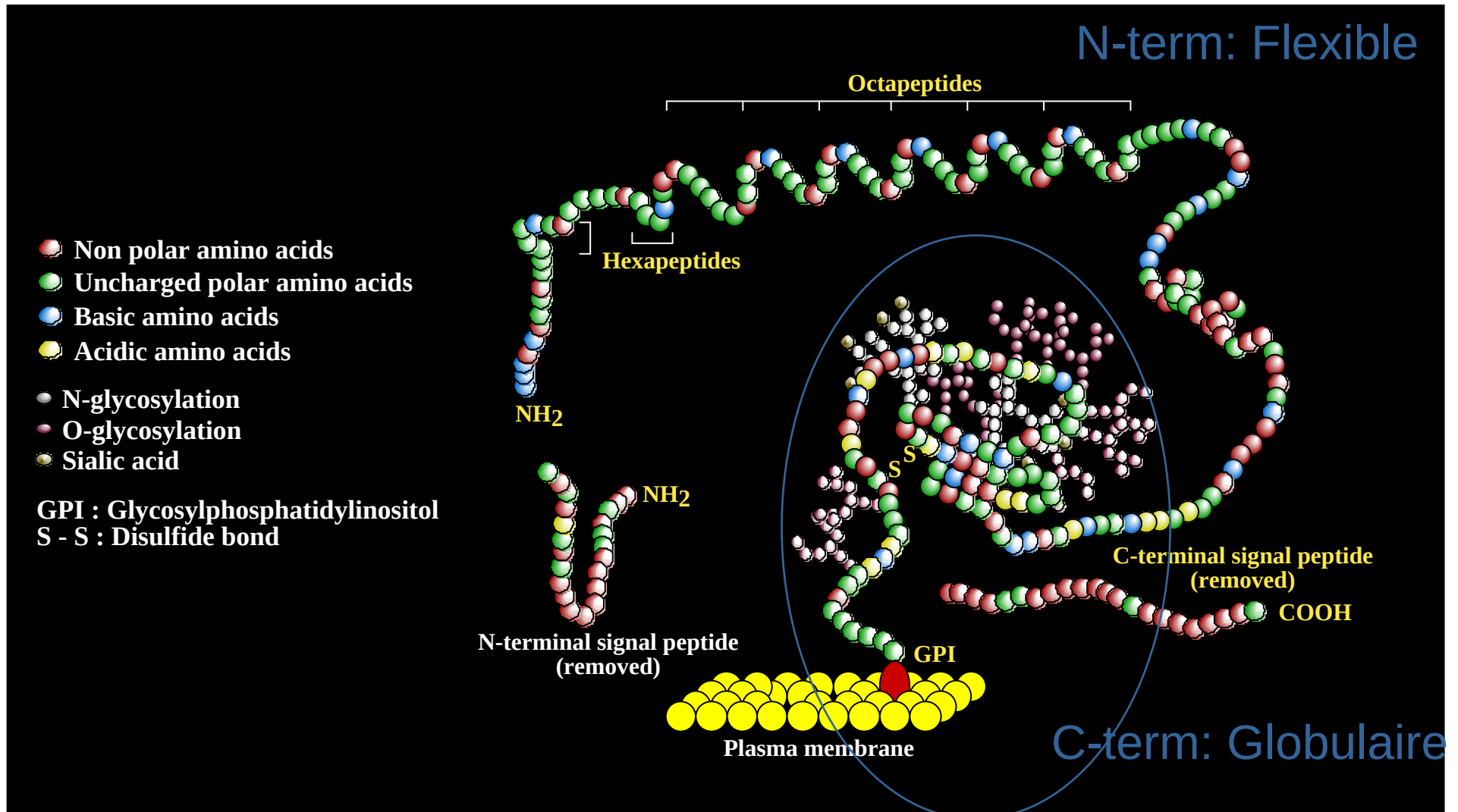
Type



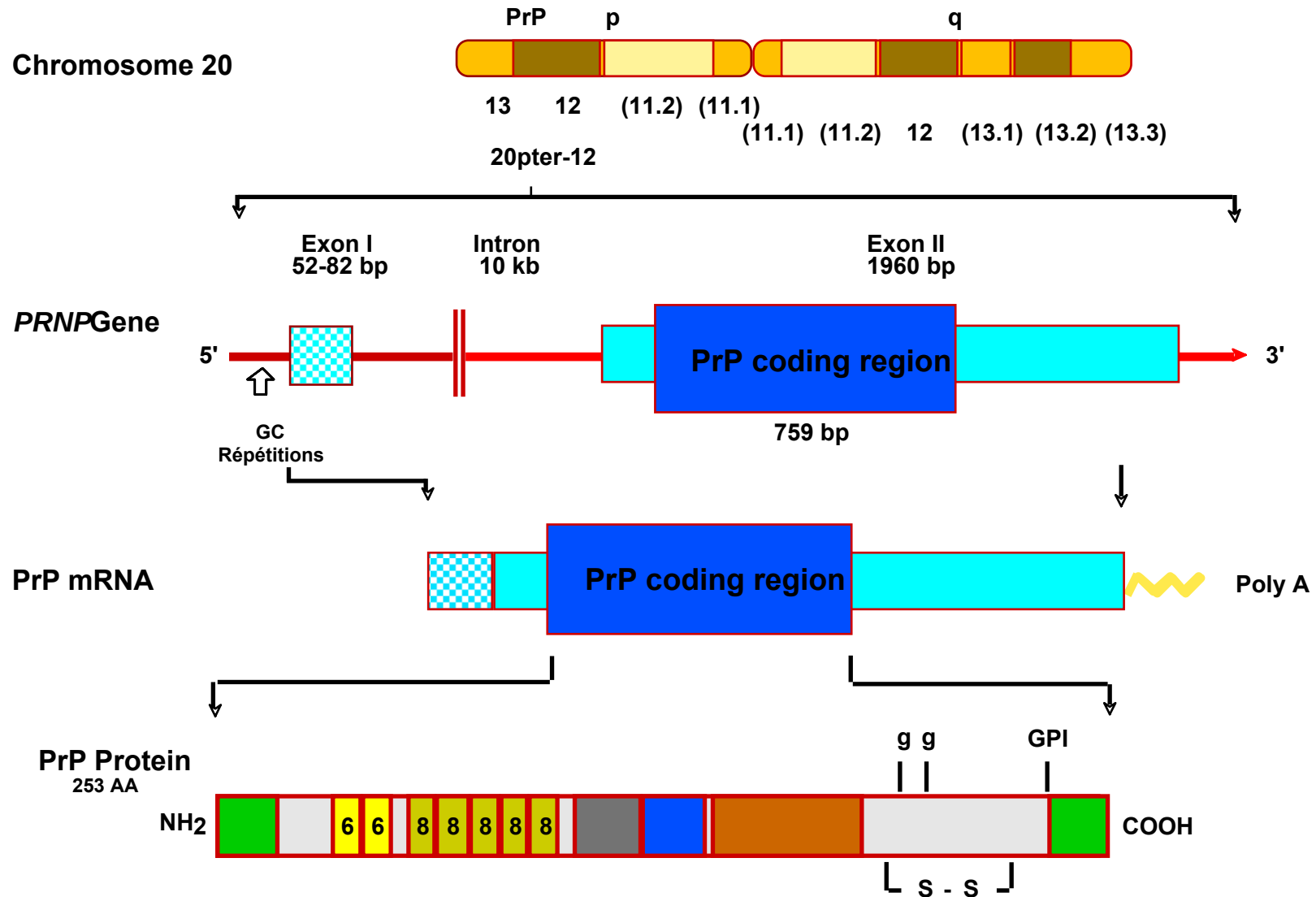
Hill et al, 1996

vMCJ

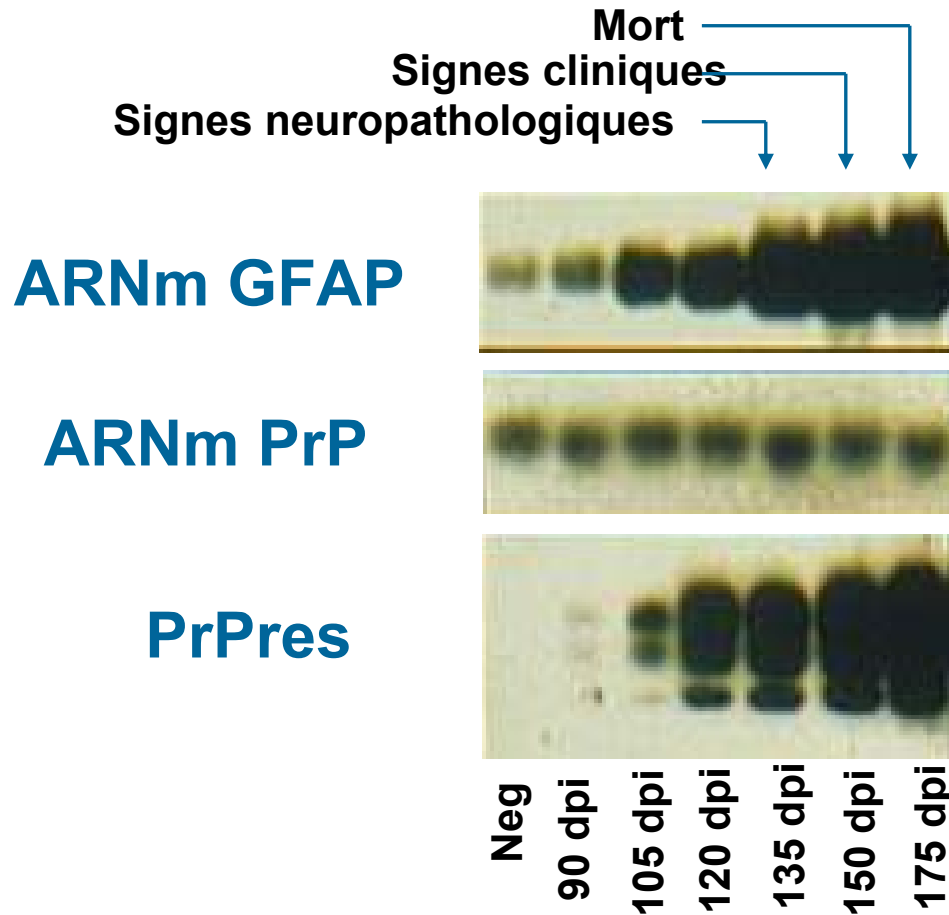
La protéine Prion (PrP)



Le gène de la PrP (humain)



Expression du gène de la PrP



Prions : Problèmes majeurs

- **Distribution périphérique (vMCJ)**
- **Absence d'une méthode diagnostic non-invasive validée, en particulier lors de la phase asymptomatique de la maladie**
- **Extrême résistance aux procédés classiques de décontamination**

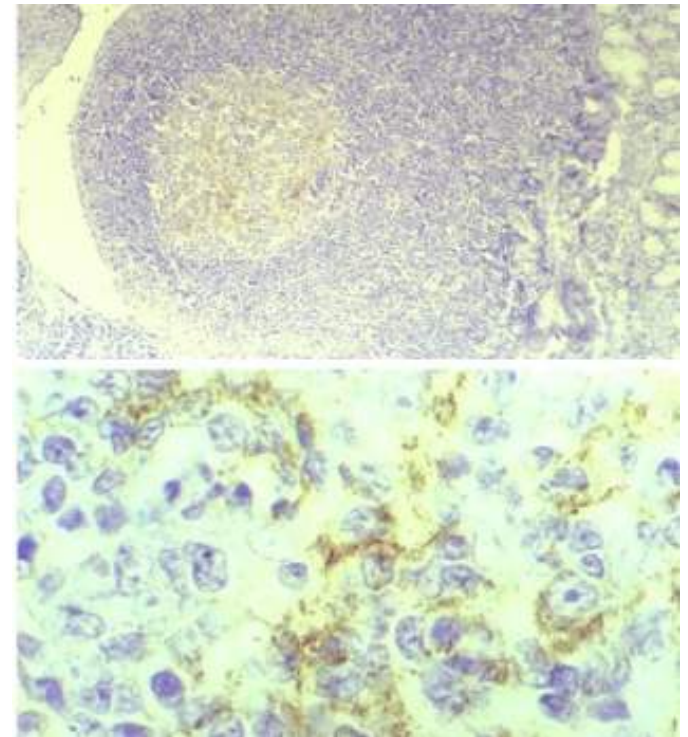
Prions : Risque Biologique

Distribution de l'infectiosité dans les MCJ

	Rate	Ganglions	Amygdale
Témoins	0/20	0/20	0/20
Maladie Neurodégénérative hors ESST	0/5	0/5	0/5
fMCJ	0/7	0/7	0/7
sMCJ	0/45	0/45	0/44
vMCJ	15/15	15/15	15/15

Collinge et al, Will et al, Ironside et al, 1999

vCJD : Tonsil - biopsy



Hauw, 2001

vMCJ : Risque accru en raison de la distribution périphérique de l'agent de la vMCJ _ système lymphoreticulaire / tractus digestif

Prions : Sang, urine & muscles

A Protease-resistant Prion Protein Isoform Is Present in Urine of Animals and Humans Affected with Prion Diseases[®]



Available online at www.sciencedirect.com

SCIENCE @ DIRECT[®]

Journal of Virological Methods xxx (2005) xxx–xxx



www.elsevier.com/locate/jviromet

Received for publication, May 28, 2001, and in revised form,
June 14, 2001

Published, JBC Papers in Press, June 21, 2001,
DOI 10.1074/jbc.C100278200

Gideon M. Shaked, Yuval Shaked,
Zehavit Kariv-Inbal, Michele Halimi,
Inbal Avraham, and Ruth Gabizon[‡]

From the Department of Neurology, the Agnes Ginges
Center for Human Neurogenetics, Hadassah University
Hospital, Jerusalem 91120, Israel

Still debated

Prion urine comprises a glycosaminoglycan-light chain IgG complex that can be stained by Congo red

Michele Halimi, Yael Dayan-Amouyal, Zehavit Kariv-Inbal, Yael Friedman-Levi,
Tehila Mayer-Sonnenfeld, Ruth Gabizon^{*,1}

Department of Neurology, The Agnes Ginges Center for Human Neurogenetics, Hadassah University Hospital, Jerusalem 91120, Israel

Received 2 September 2005; received in revised form 28 October 2005; accepted 8 November 2005

Preclinical deposition of pathological prion protein PrP^{Sc} in muscles of hamsters orally exposed to scrapie

Achim Thomzig,¹ Walter Schulz-Schaeffer,² Christine Kretzel,¹ Jessica Mei,¹ and Michael Beekes¹

¹Robert Koch-Institut, P26 – Pathogenese und Diagnostik Transmissibler Spongiformer Enzephalopathien, Berlin, Germany.

²Universitätsklinikum Göttingen, Institut für Neuropathologie, Göttingen, Germany.

The Journal of Clinical Investigation <http://www.jci.org> Volume 113 Number 5 May 2004

Prions : inactivation

Chaleur sèche

- **180°C pendant 24 heures : infectiosité résiduelle encore détectable**
- **320°C pendant 1 heure : infectiosité résiduelle encore détectable**
- **600°C pendant 15 minutes : infectiosité résiduelle encore détectable**

(Brown, 2000)

Probablement liée à la nature protéique des prions

Prions et risque de santé publique

Possible interventions

- **Source** : Difficile, voire impossible
- **Screening** : Limites techniques, encore aujourd'hui
- **Elimination** : Forte variabilité et extrapolation impossible
- **Inactivation** : Souvent incompatible avec les matériaux

Prions: Décontamination des matériels

Nouvelles HICPAC Guidelines « Special prion reprocessing »

- **Soude suivie de l'autoclavage** (e.g. 1 N NaOH, 121°C 30 min.)
- **Autoclavage : 134°C pendant 18 minutes** (autoclave à vide)
- **Autoclavage : 132°C pendant 60 minutes** (autoclave à gravité)

**Pas compatible avec les matériaux
thermosensibles**

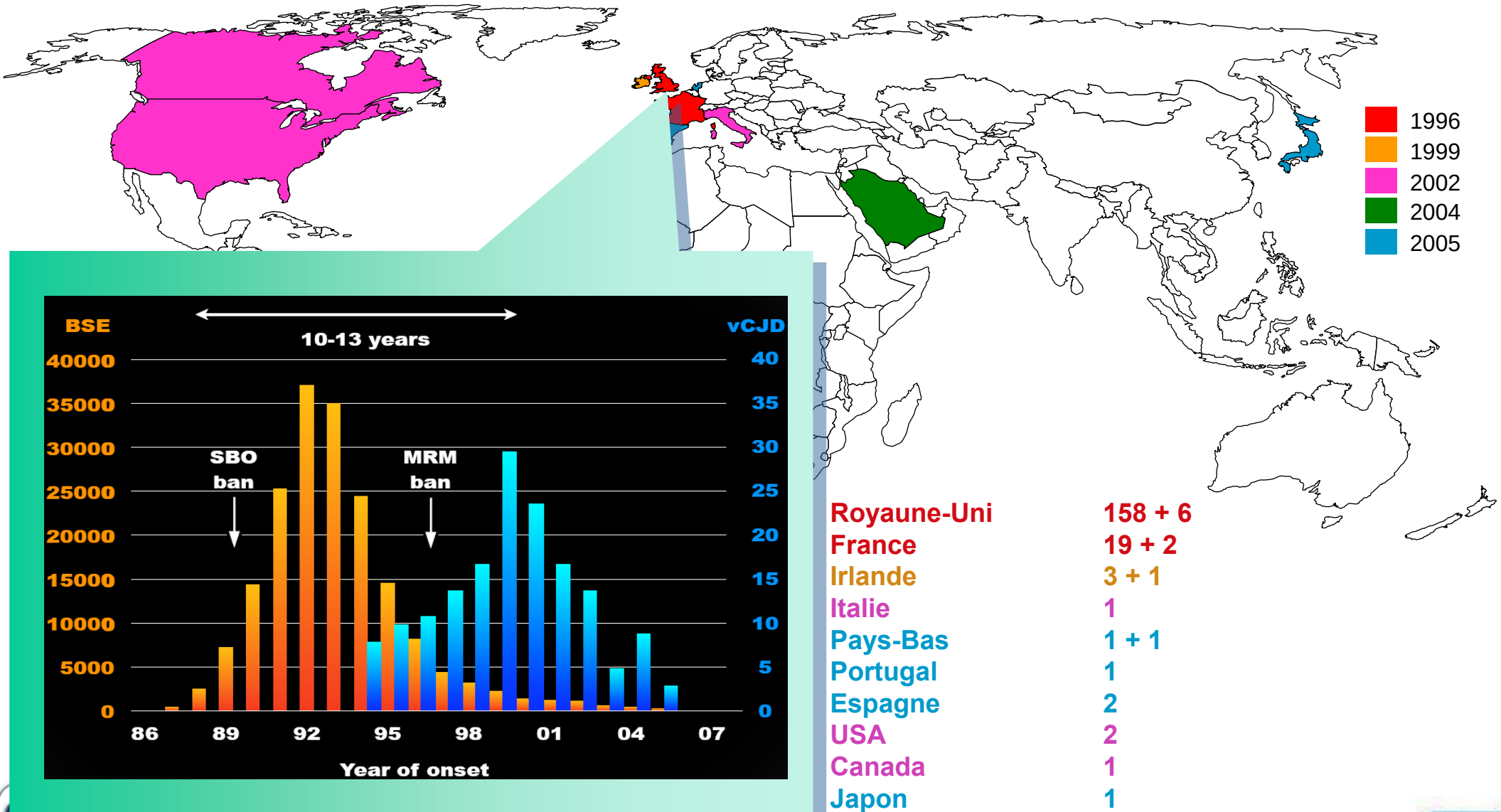
Prions: Décontamination des matériels

Exemple de la Soude

- Une heure, 1 M et température ambiante : Diminution de 4 log₁₀ du titre de PrPres d'une souche d'ESB adaptée à la souris
RF > 3,5 log₁₀
- Une heure, 0,5 M et +15°C : Diminution efficace mais pas complète du titre de PrPres
RF ~ 3 log₁₀
- Une heure, 0,5 M et +4°C : Faible efficacité
RF ~ 1,5 log₁₀

Conditions d'utilisation très importantes

vMCJ dans le Monde



« Risque Prions »

L'incidence de la vMCJ au RU décroît mais le nombre de cas reste incertains.

Alors que les autres pays n'ont pas été impliqués au même niveau, ils identifient encore de nouveaux cas e.g. Espagne.

Si les précautions prises pour prévenir l'entrée de matériel à risque dans la chaîne alimentaire sont efficaces, reste les cas de transmissions secondaires « Homme-Homme ».

Le risque de transmission au cours d'un acte chirurgical reste préoccupant, bien qu'à ce jour aucun cas n'a été mis en évidence.

 **Besoin d'identifier de nouvelles
méthodologies efficaces contre les
prions et compatibles avec surfaces
des instruments**

Etudes “STERRAD” : Objectifs

- **Comparer l'efficacité vis-à-vis des prions de différentes générations de stérilisateur basse température à des méthodes de référence : STERRAD® 100S, STERRAD® NX™ et STERRAD® 100NX™**
- **Mesurer les éventuelles interactions avec des détergents, alcalins ou enzymatiques**

Procédés et Combinaisons testées

Méthodes de référence

- Autoclave (134°C, 18 minutes)
- Hydroxyde de Sodium (1N, 1 h, T°C ambiante) suivi de l'autoclave (134°C, 18 min)

Stérilisateurs STERRAD®

- H₂O₂ gazeux : STERRAD®100S GMP, 100S, NX™, 100NX™
- H₂O₂ liquide (59% à T°C ambiante)

Détergents

- Enzymatique, à 37°C, seul ou en combinaison avec :
 - Autoclave
 - STERRAD®
- Alcalins A et B, à 55°C et 70°C, seul ou en combinaison avec :
 - Autoclave
 - STERRAD®

Etude “STERRAD” : Différentes phases

2002 - 2005 Bio-essai

- **STERRAD® 100S / méthodes de référence**
 - Autoclave et Autoclave + NaOH
 - STERRAD® 100S cycle long (1 cycle et 2 cycles consécutifs)
 - Comb. Autoclave ou STERRAD® 100S + détergents (alc. ou enz.)

2005 - 2007 Bio-essai

- **STERRAD® NX™ vs. STERRAD® 100S**
 - STERRAD® NX™ cycle Avancé (1 cycle et 2 cycles consécutifs)
 - Combinaison STERRAD® 100S ou NX™ + détergents alcalins

2007 Tests *in vitro* sur différentes souches + matériaux

- **STERRAD® 100S, STERRAD® NX™, STERRAD® 100NX™ vs. autoclave**
 - STERRAD® 100NX™ cycles Standard et Flex
 - STERRAD® NX™ cycle Avancé

Souches de Prions utilisées

263K Souche de tremblante (*in vivo* & *in vitro*)

- Souche de tremblante adaptée au hamster
- Souche de référence pour l'évaluation de nouveaux procédés capables d'éliminer ou inactiver les prions

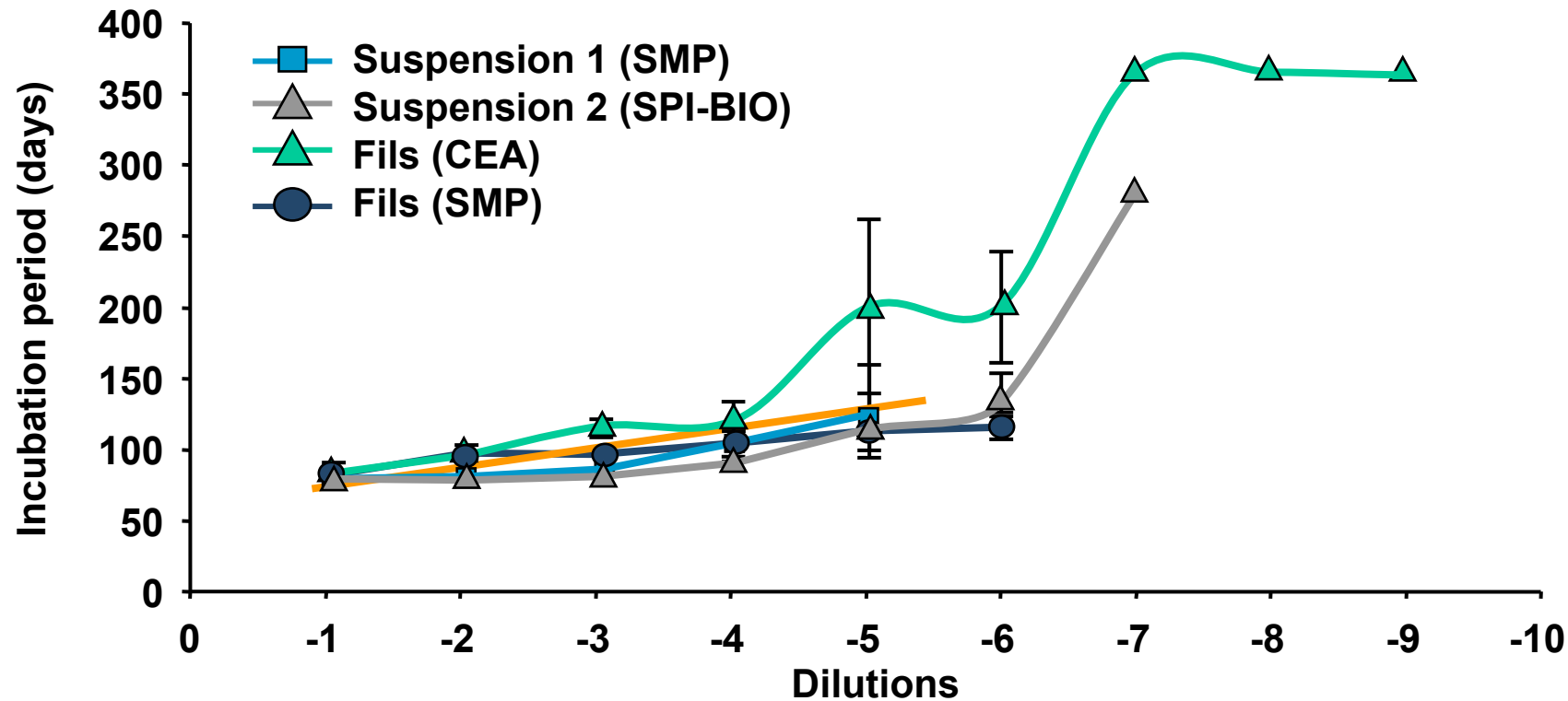
Souches “Humaines” : ESB & vMCJ (*in vitro*)

- Souche d'ESB adaptée à la souris (souche 6PB1)
- Souche de vMCJ

Bio-essai : Méthodologie

- **Fils en acier inoxydable (1.4301;** Flechsig et al., 2001)
Ø : 0,3 mm / L : 5 mm
 - Incubés dans l'homogénat de cerveau 10% (tampon phosphate) pendant 16h
 - Séchés à l'air libre à température ambiante
 - Traités par les différents procédés (sauf Témoins positifs)
 - Séchés à l'air libre à température ambiante avant implantation
- **Implantation**
 - Introduction dans une aiguille
 - Montage sur un instrument stéréotaxique
 - Fil inséré dans le cerveau d'un hamster anesthésié
- **Suivi clinique et biochimique** (Western Blot)

Bio-essai: Corrélation entre la dose infectieuse et la période d'incubation



Un retard d'incubation d'environ 12 jours correspond en moyenne à une réduction du titre infectieux de 1 log.
Au delà de 200 jours, permet de détecter une infectiosité résiduelle

Résultats 1: Groupes “Témoin”

	Taux de Transmission (%)	Période incubation (jours)	Retard d'incub. (jours)	Log-réd. calc.
Témoins négatifs (fils exposés à 10% d'homogénat de cerveau sain)	0%	606 ± 118	-	-
Témoins positifs (fils exposés à 10% d'homogénat de cerveau infecté par la souche 263K)	100%	83 ± 3	-	-
Homogénat 10% de cerveau infecté par la souche 263K	100%	78 ± 2	-	-
Fils implantés seulement 5 minutes	100%	101 ± 5	18	1,5
Autoclave 134°C 18 min	50%	428 ± 103	345	≥ 5-6
NaOH 1N 1h RT + Autoclave 134°C 18 min	28%	554 ± 197	471	≥ 5-6

- **Implantation : sans impact sur la durée de vie des animaux**
- **Implantation de 5 minutes : suffisante pour transmettre la maladie**
- **Méthodes de références : résultats cohérents avec d'autres préalablement publiés (Vadrot et Barbor, 2006)**

Résultats 2: Peroxyde d'hydrogène (STERRAD® 100S vs. H₂O₂ liquide)

	Taux de Transmission (%)	Période incubation (jours)	Retard d'incub. (jours)	Log-réd. calc.
H ₂ O ₂ , 59%, T°C ambiante, 10 min	50%	443 ± 140	360	≥ 5-6
STERRAD® 100S GMP 1 cycle long	100%	96 ± 4	14	1,1
STERRAD® 100S 1 cycle long	100%	99 ± 6	16	1,3
STERRAD® 100S 2 cycles long cons.	100%	104 ± 8	22	1,8
Autoclave 134°C 18 min	50%	428 ± 103	345	≥ 5-6
NaOH 1N 1h RT + Autoclave 134°C 18 min	28%	554 ± 197	471	≥ 5-6

- Solution de H₂O₂ : réduction significative de l'infectiosité
- Effet comparable (modéré) des STERRAD® 100S GMP et 100S
- STERRAD® 100S : 2 cycles consécutifs > 1 cycle
- Efficacité moindre par rapport aux méthodes de référence

Résultats 3: Détergents, enzymatique & alcalins

	Taux de Transmission (%)	Période incubation (jours)	Retard d'incub. (jours)	Log-réd. calc.
Détergent enzymatique à 2% (37°C, 10 min)	100%	95 ± 0	13	1,1
Détergent enzym. à 100% (37°C, 30 min)	100%	94 ± 2	12	1,0
Détergent enzym. à 100 % (37°C, 24 h)	100%	93 ± 1	11	0,9
Détergent alcalin A à 1% (55°C, 10 min)	11%	446 ± 153	363	≥ 5-6
Détergent alcalin B à 1% B (55°C, 10 min)	0%	524 ± 42	441	≥ 5-6
Autoclave 134°C 18 min	50%	428 ± 103	345	≥ 5-6
NaOH 1N 1h RT + Autoclave 134°C 18 min	28%	554 ± 197	474	≥ 5-6

- Détergent enzymatique : efficacité modérée
- Détergents alcalins : diminution significative de l'infectiosité

Résultats 4: Détergent Enzymatique Combiné avec l'autoclave ou le STERRAD® 100S

	Taux de Transmission (%)	Période incubation (jours)	Retard d'incub. (jours)	Log-réd. calc.
Détergent enzymatique à 2% (37°C, 10 min)	100%	95 ± 0	13	1,1
Autoclave 134°C 18 min	50%	428 ± 103	345	≥ 5-6
Détergent enzymatique à 2% (37°C, 10 min) + autoclave (134°C 18 min)	100%	131 ± 17	48	4,0
STERRAD® 100S GMP 1 cycle long	100%	96 ± 4	14	1,1
Détergent enzymatique à 2% (37°C, 10 min) + STERRAD® 100S GMP 1 cycle long	100%	111 ± 12	29	2,4
Détergent enzymatique à 100% (37°C, 30 min)	100%	94 ± 2	12	1,0
STERRAD® 100S 2 cycles longs cons.	100%	104 ± 8	22	1,8
Détergent enzymatique à 100%(37°C, 30 min) + STERRAD® 100S GMP 2 cycles longs cons.	67%	211 ± 125	128	≥ 5-6

- Détergent enzymatique + autoclave > détergent enzymatique seul
- Mais autoclave seul > Autoclave + Détergent enzymatique
- Détergent enzymatique + STERRAD® 100S 1 ou 2 cycles long : Effets additifs mais sans extinction de l'infectiosité

Résultats 5: Détergent Alcalin Combiné avec le STERRAD® 100S

	Taux de Transmission (%)	Période incubation (jours)	Retard d'incub. (jours)	Log-réd. calc.
Détergent alcalin A à 1% (55°C, 10 min)	11%	446 ± 153	363	≥ 5-6
Détergent alcalin A à 1% (55°C, 10 min) + STERRAD® 100S GMP 1 cycle long	0%	540 ± 14	457	≥ 5-6
Détergent alcalin A à 1% (55°C, 10 min) + STERRAD® 100S GMP 2 cycles longs cons.	0%	540 ± 30	457	≥ 5-6
Détergent alcalin B à 1% (55°C, 10 min)	0%	524 ± 42	441	≥ 5-6
Détergent alcalin B à 1% (55°C, 10 min) + STERRAD® 100S 1 cycle long	0%	540 ± 13	457	≥ 5-6
Détergent alcalin B à 1%(55°C, 10 min) + STERRAD® 100S GMP 2 cycles longs cons.	0%	552 ± 0	469	≥ 5-6

Détergents alcalins + STERRAD® 100S, 1 ou 2 cycles longs :
effets significatifs, infectiosité non détectée

Résultats 6: STERRAD® NX™

	Taux de Transmission (%)	Période incubation (jours)	Retard d'incub. (jours)	Log-réd. calc.
STERRAD® NX™ 1 cycle avancé	0%	570 ± 18	487	≥ 5-6
STERRAD® NX™ 2 cycle avancé cons.	0%	574 ± 0	491	≥ 5-6
Autoclave 134°C 18 min	50%	428 ± 103	345	≥ 5-6
NaOH 1N 1h RT + Autoclave 134°C 18 min	28%	554 ± 197	471	≥ 5-6

- STERRAD® NX™ : Infectiosité non détectée
- STERRAD® NX™ : 1 cycle avancé = 2 cycles avancé cons.

Résultats 7: STERRAD® NX™ avec Pré-treatment

	Transmission Rate (%)	Incubation Period (days)	Incub. Delay (days)	RF
STERRAD® NX™ 1 Advanced cycle	0%	570 ± 18	487	≥ 5-6
1% alkaline detergent A (55°C, 10 min) + STERRAD® NX™ 1 Advanced cycle	0%	559 ± 22	476	≥ 5-6
1% alkaline detergent B (55°C, 10 min) + STERRAD® NX™ 1 Advanced cycle	0%	562 ± 16	479	≥ 5-6
Steam 134°C 18 min	50%	428 ± 103	345	≥ 5-6
NaOH 1N 1h RT + Steam 134°C 18min	28%	554 ± 197	474	≥ 5-6

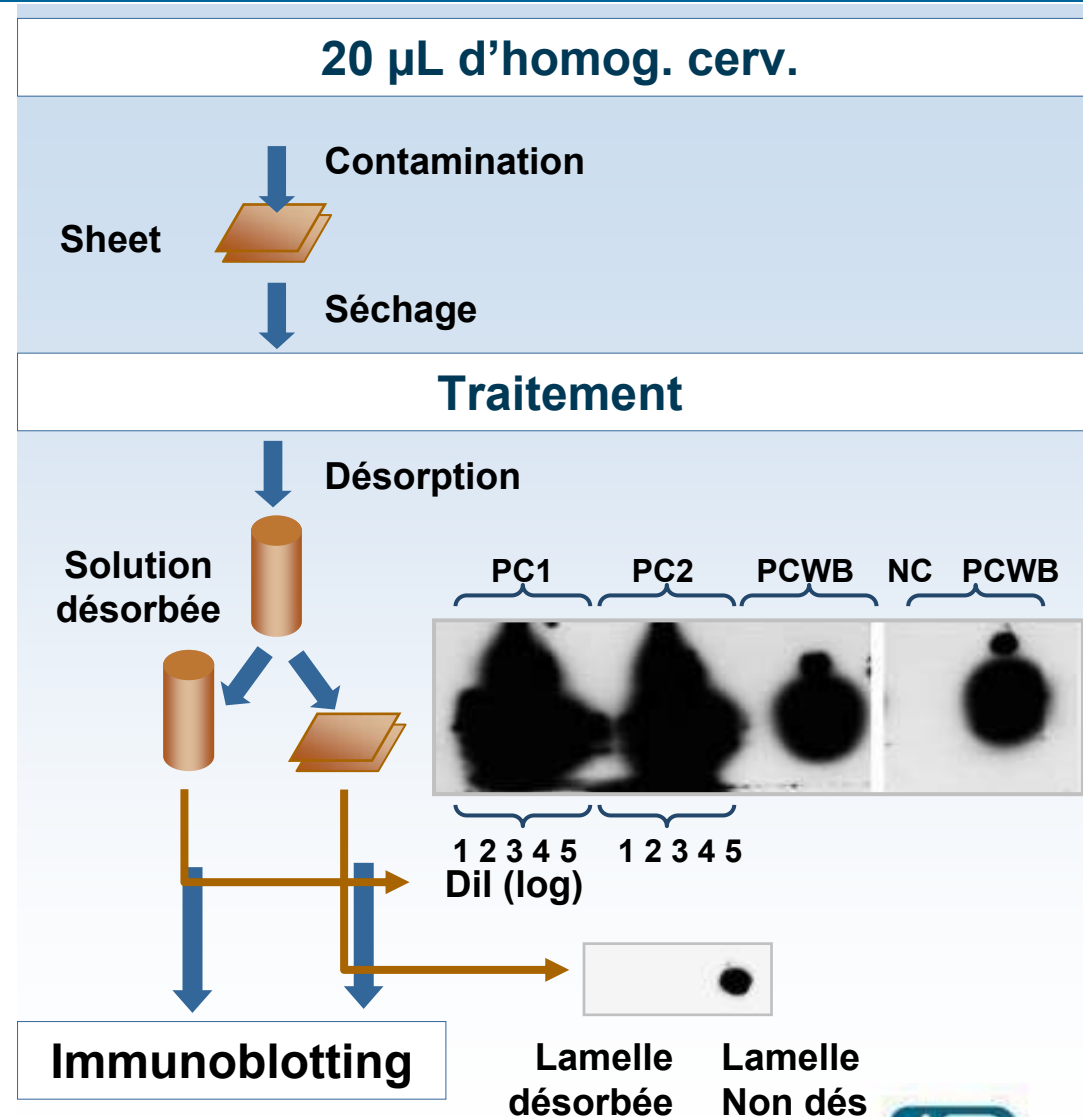
- Alkaline detergents + STERRAD® NX™ : no antagonism
- Enzymatic detergent + STERRAD® NX™ : not tested

In vitro: Méthodologie

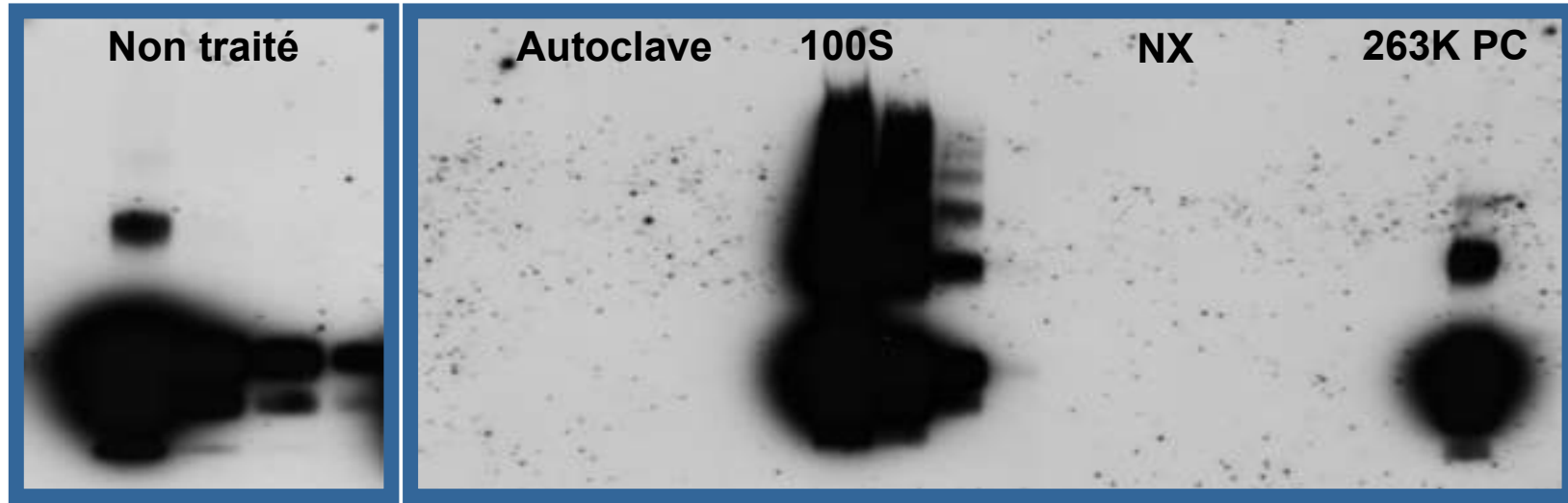
Lamelles – 9 X 9 mm

(Acier Inoxydable, Polypropylène ou Polyéthylène)

- 20 μ L d'inoculum
- Séchage à température ambiante pendant 16 heures
- Traitement par les différents procédés (sauf témoins positifs)
- Désorption (Lemmer et al., 2004)
- Détection résiduelle de la PrPres sur les lamelles
- Détermination du titre en PrPres par dilution limite dans les solutions de désorption



Résultats 8: Souche 263K STERRAD® 100S & STERRAD® NX™



Dil (log)

2 3 4 5 0 1 2 3 4 0 1 2 3 4 0 1 2 3 4

PC: Positive Control

Traitement	RF
Autoclave	≥ 5 log
STERRAD® 100S	2.5 log
STERRAD® NX™	≥ 5 log

- Cohérence avec les résultats *in vivo*
- STERRAD® NX™ > STERRAD® 100S

Résultats 9: Souches d'ESBm & vMCJ STERRAD® 100S & STERRAD® NX™

vMCJ



Dil (log)

Non-traité

0 1 2 3

Autoclave

Non-traité

0 1 2 3

100S NX

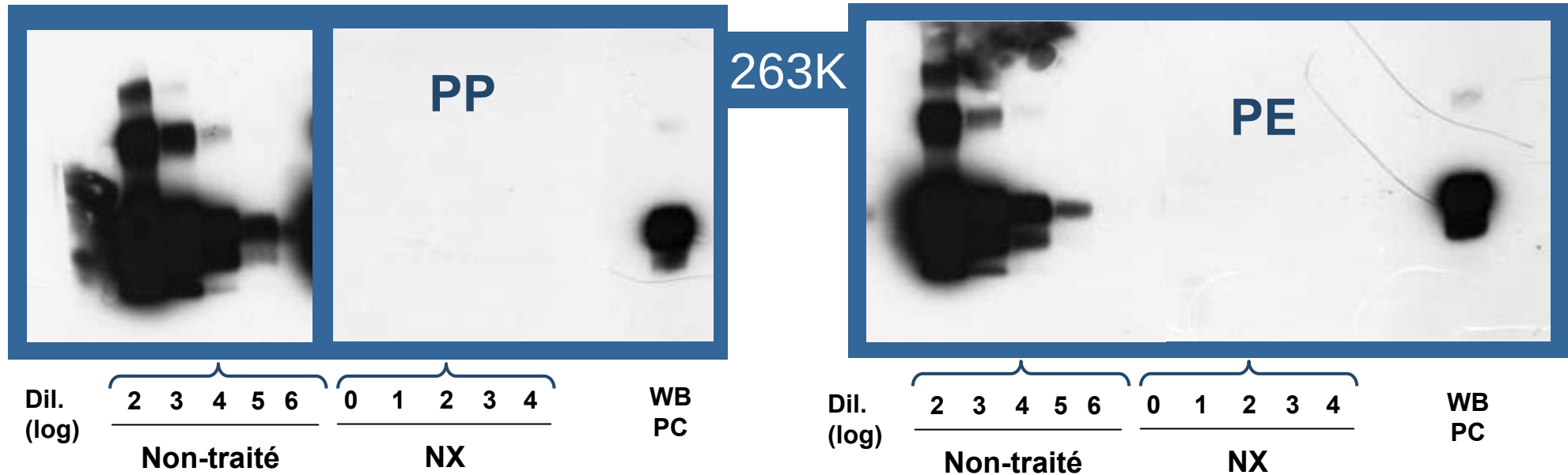
NX

Contamination	RF	Autocl.	100S	NX
50X „overloaded“ 6PB1 BH	≥ 4,5	ND	ND	ND
vCJD BH	≥ 2,5	ND	ND	ND

ND: Non détecté

- Autoclave : pas de signal PrPres (≥ 4.5 log)
- STERRAD® 100S et NX™ : pas de signal PrPres

Résultats 10: Tests sur matériaux thermosensibles STERRAD® NX™



Contamination	Non-traité	NX
Polypropylene (PP)	≥ 6,5	ND
Polyethylene (PE)	≥ 6,5	ND

0 = "Neat"

ND: Non détecté

- Efficacité identique du STERRAD® NX™ sur les différents matériaux testés (acier inoxydable, polypropylène & polyéthylène)

Résultats 11: Souche 263K

STERRAD® 100NX™



Dil (log)

2	3	4	5	2	3	4	5	6	0	1	2	3	4	WB	PC
Non-traité				Standard				Flex							

Cycle	Non-traité
“Standard”	≥ 5,5
“Flex”	≥ 5,5

STERRAD® 100NX™ = STERRAD® NX™

Conclusions

STERRAD® 100S

- **STERRAD® 100S seul : 1.3 log
(1.8 log après 2 cycles consécutifs)**
- **Détergents alcalins + STERRAD® 100S : $\geq 5-6$ log et
taux de transmission de 0% après 1 cycle long ou 2
consécutifs**

Conclusions (Suite)

STERRAD® NX™ (seul ou associé avec un détergent alcalin)

- Infectiosité non détectée (bio-essai): $\geq 5-6$ log
- Efficacité (*in vitro*) vis-à-vis de la souche 263K & des souches « humaines »

STERRAD® 100NX™

- Efficacité identique (*in vitro*) à celle du STERRAD® NX™ vis-à-vis de la souche 263K

Conclusions (Suite)

STERRAD® NX™ (*In vitro* & *in vivo*)

- Inactivation des prions
- Au moins aussi efficace que l'autoclave

STERRAD® 100NX™ (*In vitro*)

- Efficace vis-à-vis des prions
- Au moins aussi efficace que l'autoclave

Prions & STERRAD®

Se marièrent et eurent beaucoup d'enfants...



C. Rogez-Kreuz
R. Yousfi
V. Huyot
C. Aubenque
P. Clayette



Z-X. Yan
K. Roth



C. Soufflet
P. Destrez
C. Roberts
M. Favero

